INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07K 5/078, C12P 1/04, C12R 1/01, A61K 38/05, C12N 1/20 // (C12P 1/04, C12R 1:01) (11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 98/13375

A1

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

2. April 1998 (02.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/05095

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. September 1997

(17.09.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 38 870.8

23. September 1996 (23.09.96) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE
FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg
1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SASSE, Florenz [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEINMETZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, I.T, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: COMPOUNDS WITH ANTIMYCOTIC AND CYTOSTATIC EFFECT, PREPARATION METHOD, AGENT CONTAINING THESE COMPOUNDS AND DSM 11 092

(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN MIT ANTIMYKOTISCHER UND CYTOSTATISCHER WIRKUNG, HERSTELLUNGSVER-FAHREN, MITTEL UND DSM 11 092

Tubulysin A

(57) Abstract

The invention relates to chemical compounds having antimycotic and cytostatic effect, a method for their preparation from archangium gephyra strain DSM 11 092, agent containing these compounds and said strain.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung aus dem Archangium gephyra-Stamm DSM 11 092, Mittel mit den Verbindungen und dem Stamm.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	I.S	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Helgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	(L	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vor
CA	Kanada	ΙT	Italien	ΜX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ΥL	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Suden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11 092

Gemäß einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel

WO 98/13375 PCT/EP97/05095 - 2 -

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel C43H65N5O10S und mit den folgenden Parametern:

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) lambdamax (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm⁻¹.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel C42H63N5O10S und mit den folgenden Parametern

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

UV-Spektrum (Methanol) lambdamax (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm⁻¹.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem Rt-Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

- 3 -

Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH

5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (el) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Diese Verbindungen können dadurch gewinnbar sein, daß man bei Stufe (e) an einer C_{18} -Umkehrphase chromatographiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet,
daß man

- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

(f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung Archangium gephyra DSM 11 092.

Nachstehend wird die Erfindung durch experimentelle Angaben und 3 Figuren (Strukturformeln) näher erläutert.

A. Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

Das Bakterium Archangium gephyra gehört zur Ordnung der Myxococcales (Myxobakterien), Unterordnung Cystobacterineae, Familie Archangiaceae. Der Produktionsstamm Archangium gephyra Ar 315 wurde im Februar 1973 von Dr. Reichenbach aus einer Probe von einem Komposthaufen im Botanischen Garten in Freiburg, Deutsch-

land, isoliert. Er wurde 1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. DSM 11 092 hinterlegt.

A.2. Stammkultur

Die Stammhaltung erfolgt auf Agarplatten, bevorzugt auf Hefe-Agar (VY/2-Agar). Dieses Medium enthält 0,5 % Bäckerhefe, 0,1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,1 $\mu g/l$ Cyanocobalamin und 1,2 % Agar. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Das Medium wird durch Autoklavieren sterilisiert. Die Plattenkulturen werden bei 30 °C bebrütet.

A.3. Morphologische Beschreibung

Die vegetativen Zellen sind lange, schlanke Stäbchen, etwa 6 bis 9 µm lang und 0,8 µm dick. Bedingt durch die Gleitbewegung der Bakterien, breiten sich die Kolonien rasch über die Kulturplatte aus. Die Schwarmkolonie auf Hefeagar ist dünn, filmartig, rötlich braun. Wie an dem um die Kolonien entstehenden Klärhof zu erkennen, werden die Hefezellen im Medium abgebaut. Auf diesem Medium bildet der Stamm oft blaßbräunliche Fruchtkörper, die aus mäandrierenden Wülsten aufgebaut sind und stark lichtbrechende Myxosporen enthalten. Letztere sind kurze, dicke, etwas unregelmäßige Stäbchen, etwa 2,5 bis 4 mm lang und 1,2 bis 1,8 mm dick.

A.4. Leistungen

Der Stamm Ar 315 produziert Substanzen, nämlich Tubulysine, die das Wachstum von Pilzen, humanen Krebszellen und anderen tierischen Zellkulturen hemmen. Die Hemmstoffe können sowohl aus den Zellen wie auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

A.5. Produktion der Tubulysine

Die Substanzen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermen-

- 7 -

tation verläuft wie folgt: Ein Fermentor mit 350 l Arbeitsvolumen wird mit 300 l Kulturmedium gefüllt (Zusammensetzung: 0,5 % Probion (Einzellerprotein der Fa. Hoechst); 1,0 % Stärke (Cerestar Krefeld); 0,2 % Glucose; 0,1 % Hefeextrakt; 0,1 % MgSO₄ x 7H₂O; 0,1 % CaCl₂ x 2H₂O; 0,1 μ g/l Cyanocobalamin; Alternativen zu Probion sind Sojamehl oder Maiskleber). Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,4 eingestellt. Zur Bindung der ins Medium freigesetzten Hemmstoffe wird dem Medium 1 % (V/V) eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-16, Rohm & Haas) zugesetzt. Beimpft wird mit 10 l einer 3 Tage alten Vorkultur, die im gleichen Medium in einem entsprechend kleineren Fermentor erzeugt wurde. Fermentiert wird bei 30 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 U/min und einer Belüftungsrate von 10 Vol.-% pro min. Anfängliche Schaumbildung wird durch Zugabe von 50 ml Silikon-Antischaum (z. B. Tegosipon, Goldschmidt AG, Essen) verhindert. Der pH-Wert steigt im Laufe der Fermentation an. Der Anstieg wird durch Zugabe von 5-proz. Schwefelsäure auf 7,8 begrenzt. Die Fermentation wird nach 5 Tagen beendet.

B. Isolierung von Tubulysin A, B und C

Das Adsorberharz wird in einem Prozeßfilter (0,7 m², 100 Maschen (mesh)) von der Kultur abgetrennt, und mit 15 l Methanol im Verlauf von 3 h eluiert. Die Konzentration des Eluates erfolgt unter Vakuum bis zum Auftreten der Wasserphase, die anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert wird. Nach Einengen der organischen Phase im Vakuum bei 30 °C Badtemperatur erhält man 36 g Rohextrakt.

Dieser Rohextrakt wird durch LH-20-Gelchromatographie (Säule: d = 20 cm, l = 100 cm, Fluß 45 ml/min, Detektion 226 nm) mit dem Laufmittel Methanol nach UV-Banden in 6 Fraktionen aufgetrennt, wobei Tubulysin A, B und C in der 2. Fraktion von 110 bis 130

min enthalten sind. Nach Einengen der betreffenden Fraktion trennt man in 3 Portionen auf einer Eurosil-Bioselect (100-20-C-18)-Säule (d = 4 cm, l = 48 cm) mit dem Laufmittel Methanol/0,05 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) = 60/40 und einem Fluß von 8 ml/min. Die Detektion erfolgt bei 226 nm. $R_{\rm t}$ Tubulysin C 245 bis 260, Tubulysin B 260 bis 285 min, Tubulysin A 300 bis 320 min.

Nach Eindampfen der vereinigten Tubulysin A, Tubulysin B und Tubulysin C enthaltenen Fraktionen bis zur Wasserphase extrahiert man mit Ethylacetat und erhält nach dem Eindampfen im Vakuum und Trocknen 420 mg Tubulysin A, 240 mg Tubulysin B und 20 mg Tubulysin C. WO 98/13375

PCT/EP97/05095

Tubulysin A

 $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ [843]

DCI-MS (positiv-Ionen): 844.4543 für [M+H] +

¹H- und ¹³C-NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) lambda_{max} (log epsilon) = 225 (4.20); 250 (3.86); 280 (3.30)

- 9 -

IR KBr: ny = 3390; 2959; 2934; 2876; 1747; 1667; 1553; 1515; 1233 cm^{-1}

DC: $R_f = 0.27$

DC-Alufolie 60 F254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =

9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

 $HPLC: R_t = 9.7 min$

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2mM Ammoniumacetat (pH 5.0)

+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

- 10 -

Tubulysin B

 $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ [829]

DCI-MS (positiv-Ionen): 830.4361 für [M+H]⁺ 1H - und ^{13}C -NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) lambda_{max} (log epsilon) = 225 (4.23); 250 (3.91); 280 (3.26)

IR KBr: ny = 3421; 2964; 2935; 2878; 1742; 1667; 1550; 1517; 1235 cm⁻¹

DC: R_f = 0.25

DC-Alufolie 60 F_{254} Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: R_t = 7.3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μ m, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5.0) + 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

- 11 -

Tubulysin C

 $C_{41}H_{61}N_{5}O_{10}S$ [815]

ESI-MS (positiv-Ionen): 816.6 für [M+H]

HPLC: $R_t = 6.8 \text{ min}$

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm.

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0)

+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tabelle 1 1 H-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

Н		ulysin A		1	bulysin	
	δ_{H}	m	J[Hz]	δ _H	m	J[Hz]
2-H	2.37	m		2.39	m	
3-H _a	1.57	m		1.55	m	
3-H _b	1.83	m		1.82	m	
4-H	4.10	m		4.11	m	
5-H	7.88	d	7.5	7.76	d	9.0
8-H	8.18	S		8.17	s	
11-H	5.74	dd	11.3, 1.4	5.75	dd	11.2, 1.6
12-H _a	2.09	m		2.08	m	
12-H _b	2.36	m		2.36	m	
13-H	4.35	m		4.35	m	
16-H	4.40	dd	9.0, 8.8	4.42	dd	9.0, 8.8
17-H	7.92	d	8.8	7.88	d	8.6
19-H	2.46	d d	7.6	2.47	m	
20-H _a	1.42	m		1.42	m	
20-H _b	1.51	m ·		1.52	m	
21-H _a	1.15	d d	12.5	1.16	m	
21-H _b	1.62	m	12.6	1.62	m	
22-H _a	1.36	m		1.38	m	
22-H _b	1.53	m		1.53	m	
23-H _a	1.94	m		1.93	m	
23-H _b	2.82	dd	11.4	2.83	dd	11.3
25-H ₃	2.04	s		2.05	s	
26-H ₃	1.04	d	7.0	1.05	d	7.0
27-H _a	2.66	m		2.68	m	
27-H _b	2.73	m		2.71	m	
29-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
30-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3

6.61	d	8.4	6.62	d	8.3
6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
2.10	S		2.11	s	
1.82	m		1.84	m	
0.67	d	6.5	0.68	d	6.6
0.97	d	6.5	0.97	d	6.4
5.26	d	12.0	5.27	d	12.0
6.19	d	12.0	6.20	d	12.0
1.93	m		1.95	m	
1.08	m		1.10	m	
1.49	m		1.49	m	
0.81	t	7.5	0.80	t	7.4
0.81	d	7.1	0.80	d	7.0
2.13	m	·	2.15	m	
2.15	m		2.18	m	
1.92	m		1.48 1.50	m m	
0.82	d	6.9	0.82	t	7.0
o.81	d	6.8			
	6.96 2.10 1.82 0.67 0.97 5.26 6.19 1.93 1.08 1.49 0.81 2.13 2.15 1.92 -	6.96 d 2.10 s 1.82 m 0.67 d 0.97 d 5.26 d 6.19 d 1.93 m 1.08 m 1.49 m 0.81 t 0.81 d 2.13 m 2.15 m 1.92 m - 0.82 d	6.96 d 8.4 2.10 s 1.82 m 0.67 d 6.5 0.97 d 6.5 5.26 d 12.0 6.19 d 12.0 1.93 m 1.08 m 1.49 m 0.81 t 7.5 0.81 d 7.1 2.13 m 2.15 m 1.92 m - 0.82 d 6.9	6.96 d 8.4 6.96 2.10 s 2.11 1.82 m 1.84 0.67 d 6.5 0.68 0.97 d 6.5 0.97 5.26 d 12.0 5.27 6.19 d 12.0 6.20 1.93 m 1.95 1.08 m 1.10 1.49 m 1.49 0.81 t 7.5 0.80 0.81 d 7.1 0.80 2.13 m 2.15 2.15 m 1.48 1.50 0.82 d 6.9 0.82	6.96 d 8.4 6.96 d 2.10 s 2.11 s 1.82 m 1.84 m 0.67 d 6.5 0.68 d 0.97 d 6.5 0.97 d 5.26 d 12.0 5.27 d 6.19 d 12.0 6.20 d 1.93 m 1.95 m 1.08 m 1.10 m 1.49 m 0.81 t 7.5 0.80 t 0.81 d 7.1 0.80 d 2.13 m 2.15 m 1.92 m 1.48 m 1.50 m 0.82 d 6.9 0.82 t

WO 98/13375 PCT/EP97/05095 -14-

Tabelle 2 13 C-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

	Tubuly	sin A	Tubulysi	in B
С	$\delta_{ m c}$	m	$\delta_{\rm C}$	m
1	177.1	S	177.0	s
2	36.2	d	36.0	d
3	37.6	t	37.6	t
4	49.0	d	48.9	d
6	159.7	s	159.7	S
7	149.8	S	149.7	S
8	124.2	d	124.1	S
10	168.5	S	168.7	s
11	68.8	d	69.0	d
12	34.3	t	34.4	t
13	55.8 *	đ	55.6 *	d
15	174.2	S	174.2	S
16	52.6	d	52.6	d
18	172.8	S	172.8	S
19	68.1	d	68.0	d
20	24.8	t	24.8	t
21	22.8	t	22.7	t
22	29.6	t	29.5	t
23	54.7	t	54.6	t
25	43.8	q	43.7	q
26	18.0	q	17.9	q
27	39.5	t	39.4	t
28	128.5	s	128.4	S
29	129.9	d	129.9	d
30	114.9	d	114.9	d
31	155.5	s	155.5	s
32	114.9	d	114.9	d

33	129.9	d	129.9	d
34	169.8	S	169.7	S
35	20.5	q	20.4	q
36	30.0	đ	30.0	đ
37	19.3	q	19.3	q
38	20.2	q	20.2	q
39	68.9 *	t	68.9 *	t
40	35.1	đ	35.1	đ
41	24.1	t	24.0	t
42	10.0	q	10.0	q
43	15.3	q	15.3	q
1'	171.3	S	171.8	S
2'	42.7	t	35.5	t
3'	25.0	d	17.6	t
4'	22.0	q	10.7	q
5'	22.0	q		

 $^{^*\}delta_C$ gemessen bei 80° C

C. Wirkung

Die Tubulysine haben eine cytostatische Wirkung auf Pilze, humane Krebszellinien und andere tierische Zellkulturen (vgl. Tabelle). Sie führen in den Zellen zu einem raschen Abbau des Mikrotubuli-Gerüsts. Das Aktinskelett bleibt erhalten. Adhärent wachsende L929-Maus-Zellen vergrößern unter dem Einfluß der Tubulysine ihr Zellvolumen, ohne sich zu teilen, und entwickeln große Zellkerne, die dann in einem apoptotischen Vorgang zerfallen.

Wirkungsspektrum

Pilze	Hemmh	of [mm]
	Tubulysin A	Tubulysin B
Aspergillus niger	20	18
Botrytis cinerea	23	18
Coprinus cinereus	20	
Pythium debaryanum	20	

Agardiffusionstest: 20 μg pro Testblättchen von 6 mm Durchmesser

Humane Krebszellinien		IC ₅₀ [ng/ml]	
	Tubulysin A	Tubulysin B	Tubulysin C
KB-3-1 (DSM ACC 158)	0,01	0,02	0,1
K-562 (ATCC CCL 243)	0,1	0,2	1,5
HL-60 (ATCC CCL 240)	0,04	0,08	0,4
Tierische Zellinien			
L929, Maus (ATCC CCL 1)	0,2	0,4	2
Pt K2, Potorous tri- dactylis (ATCC CCL 56)	0,2	0,2	2

- 18 -

Patentansprüche

1. Chemische Verbindung der Formel

2. Chemische Verbindung der Formel

3. Chemische Verbindung der Summenformel $\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ und mit den folgenden Parametern:

 1 H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) lambda $_{max}$ (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm $^{-1}$.

4. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{4\,2}H_{6\,3}N_5O_{1\,0}S$ und mit den folgenden Parametern

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

UV-Spektrum (Methanol) lambda $_{max}$ (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm $^{-1}$.

5. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_t -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

- 6. Chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man
- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (el) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
- (h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

- 7. Chemische Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (e) an einer C_{18} -Umkehrphase chromatographiert.
- 8. Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

- 9. Antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 10. Cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 11. Archangium gephyra DSM 11 092.

Tubulysin A

Tubulysin B

Tubulysin C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 97/05095

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07K5/078 C12P1/04 C12R1/0 //(C12P1/04,C12R1:01)	1 A61K38/05	C12N1/20
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC	
B. FIELDS	SEARCHED		
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classificati CO7K C12P C12N	on symbols)	
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that s	such documents are included in	the fields searched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data be	ase and, where practical, search	n terms used}
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rel	evant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG FORS GMBH) 8 July 1993	CHUNG	
A	F. SASSE ET AL: "Gephyronic acinhibitor of Eukariotic protein from Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 48, no. 1, 1995, pages 21-25, XP002051795		
Furl	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family membe	rs are listed in annex.
* Special ca	itegories of cited documents :	TT later decrement au blinbad	after the international filling date
"E" earler of filing of "L" docume which citation	ent defining the general state of the art which is not sered to be of particular relevance document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(e) or to cited to establish the publication date of another nor other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	or priority date and not in cited to understand the p invention "X" document of particular rel- cannot be considered no invotve an inventive step "Y" document of particular rel- cannot be considered to document is combined w	n conflict with the application but vinciple or theory underlying the evance, the claimed invention vel or cannot be considered to when the document is taken alone evance: the claimed invention involve an inventive step when the atth one or more other such docu-
	means ent published prior to the international filling date but han the priority date claimed	ments, such combination in the art. *8.* document member of the	n being obvious to a person skilled same patent family
	actual completion of theinternational search	Date of mailing of the inte	
1	3 January 1998	26/01/1998	
Name and r	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt. Env. (-31-70) 340-2045.	Authorized officer Cervigni,	S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FP 97/05095

ometion on patent raintly men			PCT/EP 9	7/05095
Publication date	Pi	atent family member(s)		Publication date
08-07-93	DE AU	4142951 3257793	C A	13-05-93 28-07-93
			•	
·				
•				
	Publication date 08-07-93	08-07-93 DE AU	Publication date Patent tamily member(s) 08-07-93 DE 4142951 AU 3257793	Publication date Patent tamily member(s) 08-07-93 DE 4142951 C AU 3257793 A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/FP 97/05/05

		I F C	11/61 3//	05095
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07K5/078 C12P1/04 C12R1/01 //(C12P1/04,C12R1:01)	A61K38/05	C12N1,	/20
Nach der im	ternationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	sifikation und der IPK		
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE			
Recherchies IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo CO7K C12P C12N	te)		
Recherchier	le aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, so	weit dlese unter die recherch	lerten Gebiete fa	len ·
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	ame der Datenbank und evti	, verwendete Su	chbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	e der in Betracht kommenden	Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG FORSO GMBH) 8.Juli 1993	HUNG		
А	F. SASSE ET AL: "Gephyronic acide inhibitor of Eukariotic protein sofrom Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Bd. 48, Nr. 1, 1995, Seiten 21-25, XP002051795			
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Annang Pate	ntfamilie	
"A" Veröffe aber n "E" ålteres Anmel "L" Veröffer ochein ander soll od ausge- "O" Veröffe eine B "P" Veröffer dem b Datum des a	e Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen intlichung, die den allgemeinen Stand der Technik detiniert, icht als besonders bedeutsam anzusehen ist. Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist intlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zwelfelhaft ereien zu lessen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer an im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden ler die aus einemanderen besonderen Grund angegeben ist (wie führt) intlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, einstanstellung oder andere Maßnahmen bezieht mitichung, die vor dem internationalen Anmendedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Abschlusses der internationalen Recherche	öder dem Prioritätsdatun Anmeldung nicht kollidle Erfindung zugrundeliege Theorie angegeben ist "X" Veröffertillchung von bes kann allein aufgrund die erfinderischer Tätigkeit t "Y" Veröffertillchung von bes kann nicht als auf erfind werden, wenn die Veröff	m veröffertlicht war, sondern nur ze enden Prinzipe of conderer Bedeuth, ser Veröffentlich between Bedeuth, enscher Tätigkeit fentlichung mit er Kategorie in V- nen Fachmann nu gited derselben P- rnationalen Rech	um Verständnis des der der der ihr zugrundellegenden sing; die beanspruchte Erfindung ung nicht als neu oder auf tet werden ing; die beanspruchte Erfindung i beruhend betrachtet her oder mehreren anderen erbindung gebracht wird und aheilegend ist atentfamilie ist
	2. Jdfludf 1996 Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentami, P.B. 5818 Patentiaan 2	Bevolimächtigter Bedier		
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Eav. (-31-70) 40-2040	Cervigni,	s	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angeben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentlamilie gehören

Internationales Aktenzelchen
PCT/EP 97/05095

m Recherche eführtes Pater	nbericht Itdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 93130	94 A	08-07-93	DE 4142951 C AU 3257793 A	13-05-93 28-07-93
		•		